

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

JOBST KÁZMÉR

A KÉMIA ÉS MORPHOLOGIA
KAPCSOLATA
MODIFIKÁLT
NUKLEOPROTEIDEK BEN



109

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST



ÉRTEKEZÉSEK
EMLÉKEZÉSEK

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

SZERKESZTI

TOLNAI MÁRTON

JOBST KÁZMÉR

A KÉMIA ÉS MORPHOLOGIA
KAPCSOLATA
MODIFIKÁLT
NUKLEOPROTEIDEKBEN

AKADÉMIAI SZÉKFOGLALÓ

1990. DECEMBER 12.



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

A kiadványsorozatban a Magyar Tudományos Akadémia 1982.
évi CXLII. Közgyűlése időpontjától megválasztott rendes
és levelező tagok székfoglalói — önálló kötetben — látnak
napvilágot.

A sorozat indításáról az Akadémia főtitkárának 22/1/1982.
számú állásfoglalása rendelkezett.

ISBN 963 05 6556 0

Kiadja az Akadémiai Kiadó
1117 Budapest, Prielle Kornélia u. 19–35.

© Jobst Kázmér, 1993

Minden jog fenntartva, beleértve a sokszorosítás, a nyilvános
előadás, a rádió- és televízióadás, valamint a fordítás jogát,
az egyes fejezeteket illetően is.

Printed in Hungary

A természettudományos kutatás első mozzanata talán a csodálkozás a természet jelenségein, a második a magyarázat keresése, majd a vizsgáló módszerek kiválasztása, végül a kísérleti adatok értelmezése, amit esetleg az új ismeretek hasznosítása követhet. Mindez időt, nyugalmat, türelmet és odaadást kíván. Fontos szempont, hogy felkeltsük a dolgok megismerésére irányuló kíváncsiságot, és a tudás megszerzésére tett erőfeszítés megbecsülésére neveljünk. A tudomány tehát a kutatás eredménye, melyben a causalitás elve érvényesül. A kutató alapvető igényét Vergilius fogalmazta meg: „Felix qui potuit rerum cognoscere causas”. Kutatni nehéz és a kutatás mesterségét tanulni kell. Enélkül amatőrök, netán dilettánsok maradunk. Ezért köszönettel tartozom néhai Csolnoky László professzornak és szeretett Mesteremnek, Romhányi György akadémikusnak, akiktől mindazt, amit imént mondtam, megkaptam. Két, szakmájában, módszertanában, érdeklődésében, gondolkodásában, logikájában ellentétes karakter, de a mellettük töltött évek meghatározók voltak, hogy ma e Janus arcú, a morphológiát és kémiát egyaránt, igaz csak a határterületet és a kismolekulák szintjét érintő székfoglalómat megtarthatom.

Köszönetet mondok Tanítóimon túl valamennyi volt és jelenlegi Munkatársamnak, akik különböző módon, szinten és aktivitással támogattak, vettek részt munkámban. Nem utolsó sorban türelmes családomnak.

A tudománytörténetbe visszapillantva megállapíthatjuk, hogy az új tudományos felismerések (nem szívesen használom felfedezéseknek), melyeknek hatásuk volt a medicinára, ami megváltoztatta azt, vagy magából az orvostudományból, vagy más, külső forrásból indultak ki. Az orvosi mikrobiológia, mely a múlt

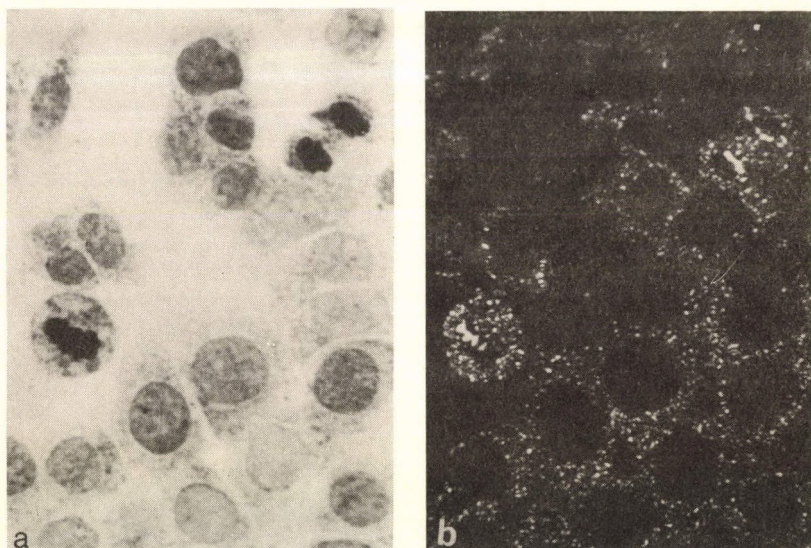
század második felében forradalmasította a klinikai orvoslást vagy századunk antibiotikumkutatása — mindkettő a medicinális eredetre példa, akárcsak az orvosi immunológia vagy anaesthesiológiai eljárások. Viszont a Rtg-diagnosztika, a modern képalkotó eljárások, mint az NMR a fizikából, nem szólva a kémiára és biokémára épült diagnosztikáinkról — kívülről penetráltak a medicinába. Elmondhatjuk ezt a műanyagkutatás termékeiről is, melyek alapját képezik a műbillentyűknek, protéziseknek. Ugyanakkor az orvoslás első tudományos tézise, természetéből adódóan morfológiai. Alapja az a felfogás, hogy az emberi lét, mint minden élő, struktúrákhoz kötött. Az emberi testet építészeti elvek, kategóriák eredményének tekintették, az alaknak, nagyságnak, a szövetek és szervek hálózatának, majd a szervek rendszerének és szerkezetének — le egészen a legkisebb egységig, a sejtig, ma az ultrastruktúráig. A szervek strukturális és funkcionális specificitása azonban csak részben hozható kapcsolatba az érintett sejtek jellemző szerkezeti felépítésével. A morfológiai leletek funkcióik tükrében is értelmezhetők, így az is látható, normál vagy kóros folyamatokkal állnak-e kapcsolatban. Ezért a pathologia, később pathophysiológiával kiegészítve az extenzív és logikus orvosi tanok alapja lett. Napjainkban ez a doktrína abból a feltételezésből indul ki, hogy a struktúrában kialakuló elsődleges elváltozás ronthatja a funkciót és tartós funkcionális károsodás szerkezeti változást eredményez, ezzel állandósítva a funkcionális eltérést.

A morfológiai—physiológiai koncepciónak két eredménye lett: egyrészt lehetővé tette a pathophysiológiai mechanizmusok megértését és fontos diagnosztikus módszerek kialakulását. Másrészt alkalmas volt a betegségek okának magyarázatára. Therápiás kihatása mindenesetre szerényebb.

Az egészséges és a kóros — beteg — tudományos magyarázatára a szisztémás második kísérletet a kémia tette. Előbb a szervek, majd a sejtek kémiai összetételét vizsgálták. A biokémia és enzimológia előretörésével a normál és kóros funkciókat egyre

gyakrabban mint a szervek, sejtek és testnedvek közti kémiai folyamatokat írták le. Kialakult egy kémiai—biokémiai koncepció, mely a következőképp körvonalazható: 1. A szervezet valamennyi physiologiás és pathologiás funkciója kémiai fogalmakkal is leírható. 2. A sejtek, testnedvek kémiai összetételében bekövetkező változás kóros folyamatokat jelez, arra utal (diagnózis). 3. A sejt kémiai funkciójában vagy a testnedvek kémiai összetételében (szervezetünk kémiájában) bekövetkező kóros eltérések kémiai komponensek célzott bevitelével (therápia) eliminálhatók.

A kémiai doktrína igen jól kiegészítette a morphologiait: mind a diagnosztikában, mind a therápiában igen eredményes volt. A biokémiai—klinikai kémiai analízis jelentőségét a klinikai diagnosztikában, differenciál diagnosztikában és a betegségek követésé-

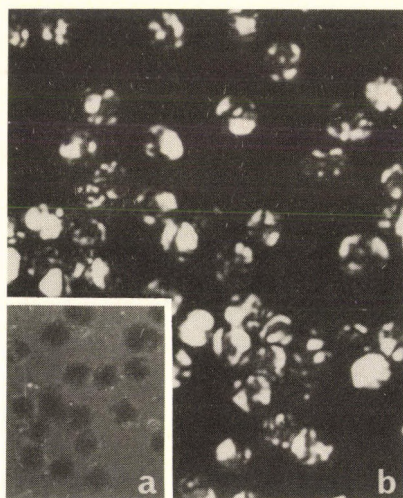


1. kép. Precipitációs toluidinkék eljárással festett Hela szövettényészet *a)* fény, *b)* polarizációs optikai felvétele. Az izotrop nyugalmi sejtmagok mellett az oszló alakok kettős törők

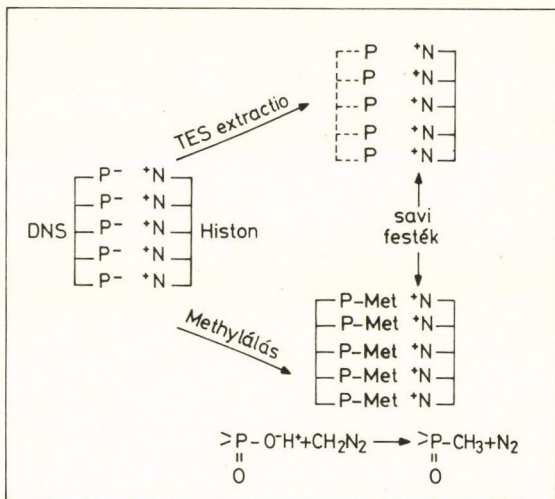
ben, monitorizálásában e helyen és testület előtt alig kell hangsúlyozni. A kémiai szemlélet azonban segítségünkre van a pathophysiologiai folyamatok megértésében is: így a veseelégtelenség, diabeteses coma, az endocrinológiában a hyperaldosterinismus, Cushing-kór-syndroma, thyreotoxycosis jórészt biokémiai paraméterekkel írhatók le, értelmezhetők. Talán ennél is fontosabb, hogy a pathologiás elváltozások kémiai interpretációja megnyitotta az utat a hatásos therápia számára.

Nem meglepő ezek után, hogy a kémiai és morphologiai doktrína az előbbiek mellett a kutatásban is jól kiegészítette és erősítette egymást, amit a nukleoproteidekre vonatkozó kísérletes vizsgálatainkkal támasztok alá, mutatok most be.

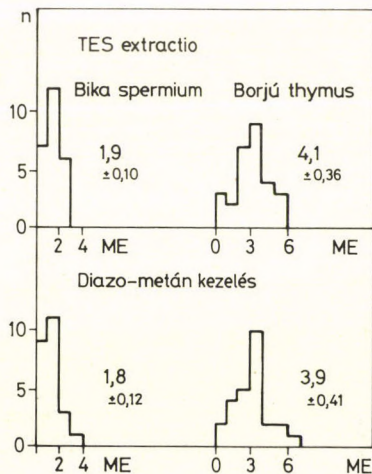
A modifikált DNS-sel nem előre tervezetten kerültünk kapcsolatba. Magyarázatot kerestünk a nyugalmi és oszló sejtmagok eltérő anizotrópiájára, amit szövetenyészetek sejtmagjainál először sikerült kimutatni [27] (1. kép). Mindezt a jelenséget, mind



2. kép. Izotóniás szukróz 140 mmol NaCl-ban izolált thymus sejtmagok *a)* fény *b)* polarizációs optikai felvétele Romhányi precipitációs toluidinkék festésével. NaCl hatására a nukleoproteidek disszociálnak és az elongált, szabad DNS kettős törő



1. ábra. Triklór-ecetsav (TES) és diazo-metán (DM) hatása a nukleoproteidekre. TES extrahálja a DNS-t, DM metilálja a DNS-P-t, így más-más úton teszik szabaddá a hisztonfehérje bázikus csoportjait a savi festékkötéshez



2. ábra. Kvantitatív citofotometriás fehérjemeghatározás TES és DM kezelt sejtmagokban. A két különböző előkezelés után mért fehérje értékek jó egyezést mutatnak

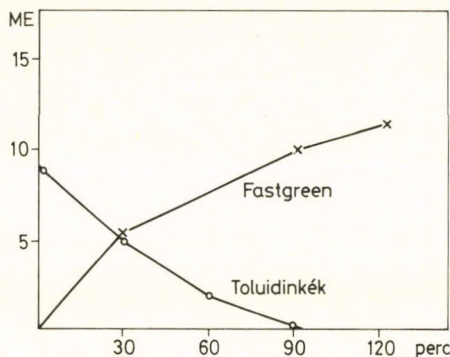
a só és tripszinkezelésre kialakuló kettős törést (2. kép) a DNP disszociációjával, a DNS-hiszonfehérje kötés fellazulásával, következményes magfehérje-vesztéssel, eliminálással magyaráztuk [20, 29, 46]. Ennek bizonyítására a bázikus magfehérjék, a hiszonok in situ kvantitatív meghatározására kerestünk az eddigi ismerteknél kíméletesebb módszert. Meghatározásukat a DNS zavarta, ezért a DNS foszfátcsoportok eliminálása a hiszonmeghatározás előfeltétele. Ehhez az alkil-foszfát észterek adták az ötletet. Alkilálással a zavaró foszfátgyökök aciditása tompítható, és a keletkező foszfátészterek már nem zavarják a bázikus fehérjék savi festékfelvételét, mennyiségi meghatározását.

A DNS triklór-ecetsavas (TES) extrakciója helyett maszkírozására metilálást alkalmaztunk (1. ábra). Számos próbálkozás után [18] főképp a kémiában preferált nitrozo-metil-karbamidból (NMC) előállított diazo-metánt (DM) választottuk [44].

20 °C-on 2 óra után az éteres közegben végzett DM kezelésre a különböző szöveti magokban pH 8,1-es Fast green-nel a TES extrakcióval egyező kvantitatív hiszonfehérje értékeket mértünk [16] (2. ábra). Ez arra utalt, hogy a bázikus magfehérjék savanyú festékfelvételét gátló DNS foszfátgyökök aciditását a DM-es alkilálással sikeresen tompítottuk. Ezt megerősítette, hogy e sejtmagok a foszfát dependens galloctaninnal (GC) vagy toluidinkékkel, tehát típusos magfestőkkel nem, de Fast green-nel intenzíven festődtek (3. ábra). A DNS módosítására végzett, itt nem részletezett kísérletek alapján, a fehérjék reakciója biztonsággal nem volt kizárható, bár a kvantitatív festékfelvételi adatok ezt nem támasztották alá.

Bemutatott eredményeinknek volt egy különösen gyenge pontja: nem tudtuk magyarázni, a rivanollal nem festődő, de anizotrop alkilált magok miért nem adják a DNS-re jellemző, a foszfátcsoportok módosulásától független Feulgen-reakciót?

Ennek megközelítésére először meghatároztuk a thymus magok rivanol anizotropia változását, majd festékfelvételét frakcionált DM kezelés után [17]. A maganizotropia 30 perces kezelés



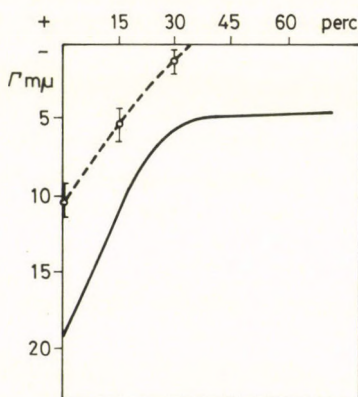
3. ábra. Metilálás hatása a thymus sejtmagok savanyú (fast green) és bázikus (toluidinkék) festékkötésének időbeni változására

után még csökken, később azonban konstans; a kettős törés intenzitása a rivanollal nem festett magokéval közel azonos. Vagyis 30 perc után az alkilált festetlen magok anizotrópiáját mértük. Ezt a DM kezelt magok csökkent GC és konstans Fg pH 8,1 felvétele is megerősítette, és alátámasztotta a DNS foszfát-csoportjainak reakcióját. Mindez még nem magyarázta a negatív Feulgen-reakciót. Ezért a DM-al kezelt magokat Feulgen szerint hidrolizáltuk: a festékfelvétel és kettős törés fokozatosan csökkent, és az ilyen, megelőzően 30 percig DM kezelt magok izotropok (4. ábra). Ennek alapján feltételezhetjük, hogy a DM kezelt magok DNS-e savkezelésre depolimerizálódott. Ezért megvizsgáltuk a hidrolizáló savat, melyben a metilált DNS depolimerizációs fragmentjeinek kimutatását terveztük.

Az alkilált DNS totál hidrolízise után a kromatogramokon 9 fluoreszkáló foltot találtunk, a nem metilált DNS 4 foltjával szemben [17]. Előbbiekből 4 a DNS bázisoknak felelt meg. A további 5 foltból az R_f értékek és a spektrum alapján a 7-metilguanin (7-MG) egyértelműen azonosítható volt. Az *N*-3-metiladenin, *N*-1-metiladenin és *N*-4-metil-citozin, az *N*-3-alkilguanin jelenlétét mi akkor megnyugtatóan nem tudtuk, mint

lehetséges származékot, anyagunkban azonosítani [36, 37]. A 7-MG esetünkben különös jelentőséggel bírt, mivel ismerten destabilizálja a DNS-molekulát. Ennek során a DNS-molekula depurinizálódása, a redukáló apurinsav (APS) képződés és a cukor-foszfát kötés hasadásával a molekula depolimerizációja alakul ki. A DM-os alkilálás során tehát nemcsak a DNS-foszfát reakcióval kell számolnunk, hanem alkilált bázisok keletkezésével is.

Megfigyelésünknek ez ideig csak hisztokémiai jelentőséget tulajdonítottunk. A szövetmetzetek DM kezelést követően identifikált 7-MG óhatatlanul felvetette a megváltozott genetikai kód gondolatát és ennek következményeit: mutagén, cancerogén, teratogén változások kialakulását. Más nitrózaminokra több ilyen adat van, de nem volt ismert, in vivo az NMC-ből képződnek-e alkilált bázisok, annak esetleges biológiai következményével. Az NMC biológiai hatását bizonyító kísérletekkel csupán az volt célunk, hogy az in situ kémiai modifikálással kapott eredmények gyakorlati következményeire adatot szolgáltatassunk. Míg mi az in situ leletek alapján jutottunk el az NMC terato-cancerogén hatásának feltételezéséhez, mások az ún. „transzport elv”-



4. ábra. Thymus magok rivanol anizotrópiájának alakulása frakcionált DM kezelésre (kihúzott vonal), és a DM kezelést követő Feulgen szerinti savkezelésre (szaggatott vonal)

ből kiindulva (bizonyos vegyületekből az aktív alak csak metabolikus aktiválódás során keletkezik) vizsgálták szisztemásan hatásukat és jutottak e felismeréshez [9].

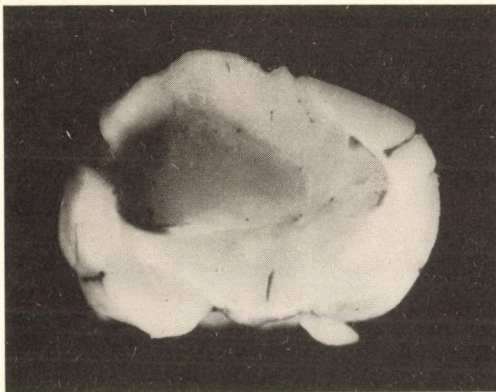
Az NMC mutagenitását *Shigella Flexneri* Kétyi mutatta ki Munkatársával [39], magunk daganatnövekedést gátló hatását igazoltuk [22]. A kísérletes daganatokat 100 g-os, különböző nemű patkányokban változó dózisu iv. és ip. NMC kezeléssel

1. táblázat. NMC-DM kezeléssel előidézett patkánytumrok szervi megoszlása

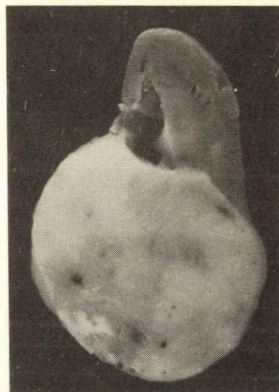
Brochus papilloma	23	20%
Nyál-verejték-pajzsmirigy adenoma	14	12%
Gyomor polyp	2	2%
Vesesarcoma	51	47%
Idegrendszeri daganat	17	15%
Egyéb atypusos tumor	5	4%
Soliter tumor	73	65%
Kettős tumor	39	35%

indukáltuk [21], az eredményeket 2, 5, 8 hónap után értékeltük. A túlélő állatok csaknem 80%-ában nagyrészt már makroszkóposan is típusos vagy atípusos daganatot találtunk (1. táblázat). Ezek mikroszkóposan gyomor, bronchus papilloma, adenoma (vese, pajzsmirigy), központi idegrendszeri daganatok (ependymoma, oligoendroglioma) (3. kép), myeloid leukaemia és dominálón vesesarcomák (4. kép) voltak. A kvantitatív DNS és hiszton méréseink szerint az NMC-vel indukált típusos daganatok diploid, az atípusosak triploid, hypertetraploid sejtvonalat mutattak. Vesetumoraink nagyobb részénél a mitosis index igen magas volt, míg az idegrendszeriekre ez nem volt jellemző.

Az NMC-vel indukált tumoraink lokalizációjára vonatkozó leleteink eltértek az irodalomban más alkiláló szerekre közöltek-től. A szerzők első helyen idegrendszeri daganatot észleltek, míg



3. kép. Oldalkamrából kiinduló, részben vérzéssal telített ependymoblastoma az ellenoldali félteke dislocatiojával



4. kép. A vese alsó pólusán ülő diónyi, jól körülhatárolt, szövettanilag differenciálatlan sejtes sarcoma

anyagunkban i.p. kezelés után csaknem kizárólag vesesarcoma dominált [32]. Leleteink értékelésénél figyelembe kell venni a metilált DNS labilitását, amire in vitro vizsgálatainkban már utaltunk. Ennek alapján nem zárható ki, hogy az alkilált DNS-molekula depurinizációja, az APS képződés szöveti viszonyok közt, a szöveti pH-n spontán bekövetkezik.

A daganatok kialakulása kapcsolatban áll a szomatikus sejtek reprodukív képességével. Gyorsan növekedő, osztódó sejteket physiologiásan elsősorban a differenciálódó embrióban találunk. Kémiai-biológiai ágensek hatására a szöveti differenciálódás zavart lesz, amint azt számos cancerogén szerről kimutatták. Az onco- és teratogenesis közti kapcsolat tehát szoros; gyermekekben pl. a Wilms tumor és veleszületett fejlődési rendellenességek együttes előfordulása nem ritka. Ezért megvizsgáltuk, ugyanazon állatban NMC kezeléssel indukálható-e fejlődési rendellenesség és tumor.

Kísérleteink szerint iv. NMC-vel kezelt terhes patkányok intrauterin elhalt utódaiban mikrocephalia (5. kép), a telecephalon



5. kép. A párosítást követő 3. nap iv. NMC-vel kezelt patkány macerált utódai (középen kontroll újszülött állat). Jól felismerhető a hypoplasiás telencephalon

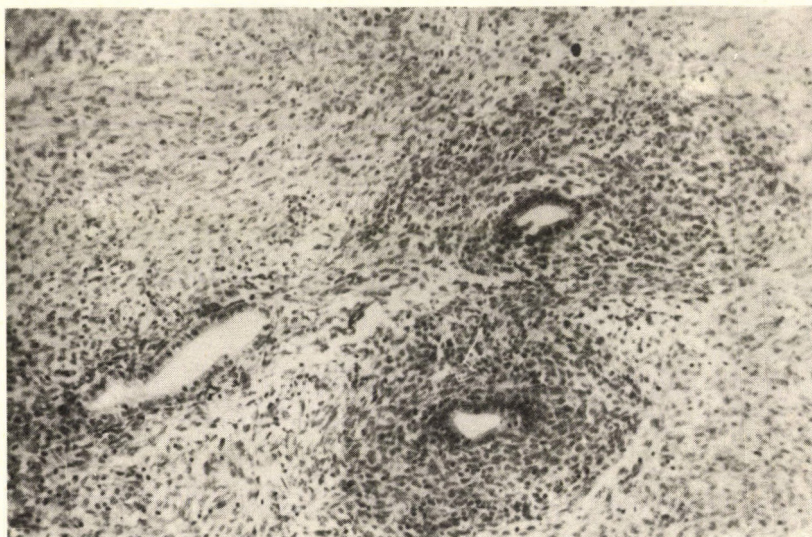
hypoplasiája alakul ki [19]. NMC-vel kezelt anyák életképes utódait továbbkezelve, a felnevelt, kifejlett utódokban ugyancsak megtaláltuk a telencephalon fejlődési zavarát (6. kép), de a vesesarcomát is (7. kép), csakúgy mint az anyákban.

E kísérletek egyrészt az *in vitro*, kémiai metilálást, modifikálást követő DNS szerkezetváltozás kvantitatív hiszton morfológiai, hiszton meghatározási eredményét, másrészt biológiai hatását mutatták be. Véleményünk szerint az NMC *in vitro* hatásáért nem az NMC-molekula, hanem a szervezet alkális miliójában az NMC-ből képződő diazo-metán, vagyis egy nagyhatású metiláló szer a felelős.

A DNS enzimatis metilálására az első adatok a 80-as évek elejéről származnak [1]. A DNS metiltranszferáz vagy metiláz enzim az S-adenozilmetioninról viszi át a metilcsoportot a DNS-re. Elsősorban 5-metil-citozin, de N^8 -metil-adenin és N^4 -metil-



6. kép. NMC-vel a terhesség első 5 napján ip. kezelt patkány utódainak agya a születést követő 8. hónapban (bal oldalt kontroll állat). Az állatokra a mikrocephalia (agy súlya 1,2 g; kontroll 1,5 g) a hypoplasiás telencephalon és olivák hypertrophiája jellemző



7. kép. A mikrocephal patkányokban (lásd 6. kép) kialakult vesesarcoma. Szövettanilag pseudotubularis részek, számos sejtoszlással. HE festés

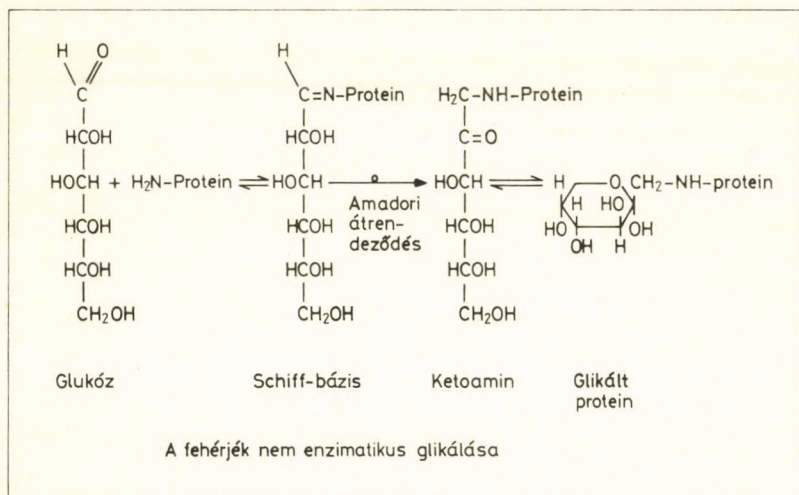
citozin is keletkezik. A DNS replikáció során a gazda fonál megtartja metilált bázisát, de a leánystrand kezdetben még nem metilált: a DNS így hemimetilált. Ez azért is érdekes, mert a DNS-t igen stabil molekulának tartjuk, mely generációról generációra megtartja szerkezetét. Metilálással azonban mégis módosul, aminek alapvető következményei lehetnek. Míg a metil-citozin stabilizálja a DNS kettőshelixet, a metil-adeninnek hatása ellentétes. Az alterált bázis módosítja a DNS fehérje kötését és funkcióját. Nincs definitív adatunk, hogy a metilált bázisoknak meghatározó szerepük volna a differenciálódásban. Szövettenyészetben azonban kimutatták, hogy a DNS bizonyos pozíciói folyamatosan metilálódnak. Krónikus myeloid leukæmia stacioner fázisában a gén metilált, míg progresszió esetén hipermetilált [42]. Ez azért is fontos, mert a metilálásnak génaktiváló szerepet tulajdonítanak [1]. Aktiválódva zavar áll be a sejttanyagcserében, csökken a sejtnövekedés (öregedés?) és ez sejthalálhoz vezethet. A metilált DNS esetében nagyobb a valószínűsége, hogy a tumor szuppresszálo gén inaktíválódhat. Ezen adatok összességükben arra utalnak, hogy a metilált bázisok egyrészt a DNS funkciójának regulálásában játszanak kulcsszerpet [6]. Másrészt a génexpresszióban és a chromatin szerkezetében a szövetspecifikus chromosomális fehérjéknek, ezen belül a hisztonoknak is szerepük van [38, 50].

A hisztonokkal, a nukleoproteideknek már említett fő fehérje komponensével sem előre tervezetten kezdtünk újra foglalkozni. A klinikai kémiai napi rutin diagnosztikai vizsgálatok adták az ötletet [34]. Valójában ez a felismerés, gondolatársítás ma számomra a legszebb a soron következő, immár szisztémásan felépített vizsgálatokban.

Alig 20 éve ismerték fel, hogy diabetesben, de idős korban is a haemoglobin mellett [2, 13] a szemlencse krisztallin, a kollagén, myelinfehérje, az erek basalis membránja, lipoproteinek, enzimek, de a DNS aminocsoportja is posttranszlacionálisan, nem enzimatikusan glikálható [3]. A Maillard-reakció néven az élel-

miszer-kémiában a századfordulótól ismert ez az ún. „barnulási reakció” [40]. Ennek során a redukáló cukrok és a fehérjék primer amino-, leginkább a lizin ϵ -amino-csoportja közt Schiff-bázis, majd Amadori-átrendeződés után [33] a sárga Maillard-végtermék alakulhat ki (5. ábra). A glikált LDL nem jól kötődik a sejtek LDL receptoraihoz [8, 31, 49]. Ezért cukorbetegéknél emelkedik a szérum koleszterin szint. A nem lebomló lencse krisztallin elveszti átlátszóságát, a kollagén pedig rugalmasságát. A cukorbetegség viszonylag korai öregedését a szövetek glikáltságával is kapcsolatba hozzák [3].

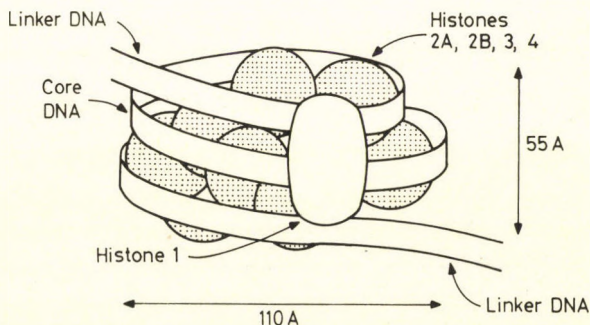
A cukorbetegség, diabetes mellitus anamnesztikus állapotának regisztrálására a glikált haemoglobin A1C mérést [13], újabban a szérumfehérjékre kidolgozott fruktózamin próbát alkalmazzuk [26]. Utóbbi meghatározására bevezetett NBT reakció standardizálásával foglalkozva jöttünk rá [34], hogy a fehérjékben, így pl. a szérumalbuminban is elsősorban a bázikus lizin aminosav



5. ábra. A fehérjék primer aminosóportjának posttranslacionális, nem enzimatisz glikálása. Főképp a lizin epszilon aminosóportja lép redukáló cukrokkal reakcióba

láncvégi epszilon aminocsoportja glikálódik. Legtöbb lizin ismerten a bázikus hiszton típusú magfehérjékben van. Meglepő volt ezek után, hogy a szervezet legbázikusabb fehérjéinek, a sejtmag lizingazdag hisztonjainak glikálására nem találtunk adatot. Ezért kezdtük el elsőként a hisztonok glikálását tanulmányozni.

Az eukariota chromatin ismétlődő szerkezeti alapegysége a nucleosoma (6. ábra), mely core és linker nukleosoma -DNS részből épül fel [41, 45, 12, 28, 11, 39]. A DNS kettős spirál a 2A, 2B, 3 és 4 hisztonfrakcióból felépülő oktamért fogja körül, míg a H1 hiszton kívül kapcsolódik a core és linker DNS-hez. A felépítésből következik, hogy a különböző hisztonoknak és módosulásainak fontos szerepe van a chromatin szerkezetében és funkciójában. A core hiszton erősen konzervált szerkezetével szemben a linker H1 hiszton kisebb mértékben az. Ugyanakkor felelős a magasan rendezett, szolenoid szerű nucleosoma szerkezet fenntartásáért, de a sejtproliferáló szabályozásáért is [4, 43]. A hisztonfehérjék rendkívül konzervatív karaktere, primer szerkezete arra mutat, hogy e polipeptid lánc nélkülözhetetlen a nucleosoma szerkezetéhez, és a poszttranszlacionális acetilálás [7] konzervált, kiválasztott pozíciói az eukaryota chromatinban e modifikáció alapvető funkcionális jelentőségét sejtetik. A chro-



6. ábra. A nucleosoma szerkezet McGhee és Felsenfeld (1980) után

mosomális, nem hiszton típusú fehérjéknek nagy csoportját az ugyancsak konzervatív, az ún. „High Mobility Group” (HMG) fehérjék alkotják [10], melyek sok tulajdonságukban hasonlítanak a hisztonokra, szerepük van a génexpresszióban és DNS replikációban [38]. A hisztonokhoz hasonlóan poszttranszlacionálisan metilálhatók, foszforilálhatók, acetilálhatók [5, 15], amint a szérum- és struktúrfehérjék is modifikálódhatnak.

Vizsgálatainkhoz összhisztont és hiszton frakciókat borjú thymusból izoláltunk [25]. Összehasonlításként gyári készítményeket is glikáltunk. Más kísérletben diabeteses egyének májából izoláltunk hisztont. Glukóz mellett más redukáló cukrokkal, glukóz-6-foszfáttal (G-6-P) is inkubáltunk. A glikáltság fokát a redukción alapuló NBT reakcióval mértük [26]. Esetenként savas hidrolízist követően vékonyréteg-kromatográfiás és HPLC analízist végeztünk a napjainkban újra felfedezett oximetilfurfural, ill. furosemin kimutatására, amit Udránszky László, a kolozsvári, majd budapesti egyetem élettan professzora, akadémiai levelező tagja már 1888-ban leírt [48].

Megállapítottuk, hogy eltérő lizintartalmuk ellenére a vizsgált hisztonfrakciók natív glikáltsága alig tér el a különböző albuminokétól, szérumfehérjétől (2. táblázat). A protamin nem glikált.

2. táblázat. Különböző fehérjék „natív” glikáltsága az NBT reakcióval mérve és $\Delta A/g$ fehérjében kifejezve. A H1 hiszton kivételével mind lizinben, mind glukózfelvételben hasonló értéket mutatnak

Fehérje	$\Delta A/g$ fehérje	Lizin mol%
Hiszton (össz) borjú thymusz	1,5—2,5	15
H1 Borjú thymusz	0,1—0,5	30
Bovin albumin	1,5—3,0	10
Humán albumin	0,8—1,5	10
Humán szérum	1,0—1,1	
Protamin	0	0

Ha e készítményeket 66%-os vizes alkoholban oldott 300 mmol/l glukózzal 10 000 U aprotinin enzimgátló jelenlétében 1-től 30 napig 37 °C-on inkubáltuk, igen eltérő glukózfelvételt találunk (3. táblázat). Mind a humán, mind a bovin albumin 30 nap után a 15 napig inkubált összhisztonnal egyező glikálságot mutatott. Ugyanakkor a H1 hiszton glukózfelvétele többszöröse volt az összhisztonénak. A protamin guanidocsoportja nem glikálható.

Az összhisztton elemanalízise (4. táblázat) is jelentős glukózfelvétel mellett szólt [35]. A glikált hisztonok alacsonyabb nitrogén-értéke 10 w/w% glukózfelvitelre utalt. A 110 Daltonos átlag aminosav moltömegből és a hiszton 15% lizintartalmából kiindulva számításunk szerint a lizinmolekulák 45%-a glikálódott. Megvizsgáltuk 0,15% Triton X100 tartalmú savanyú ureás akril-

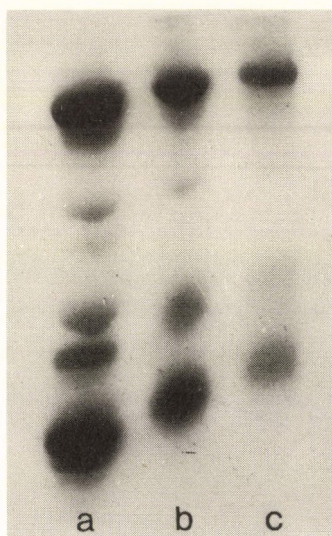
3. táblázat. Különböző fehérjék in vitro glukózfelvétele (300 mmol/l) 37 °C-on 66%-os vizes-alkoholos közegben; mérés NBT reakcióval

Fehérje	Eljárás	$\Delta A/g$ fehérje
Hiszton (össz) borjú timusz	66%EtOH	
	10 nap	40—50
	15 nap	50—70
	30 nap	100—150
	PBS pH 8,9	
H1-Hiszton borjú timusz	15 nap	25—30
	66%EtOH	
	15 nap	250—300
Humán albumin	PBS pH 8,9	
	8 nap	25—30
	30 nap	40—60
Bovin albumin	PBS pH 8,9	
	2—10 nap	15—20
	17 nap	40
	30 nap	40—50
Protamin	PBS pH 8,9	
	10 nap	3—4

4. táblázat. Hiszton és glikált összhiszton elemanalízise

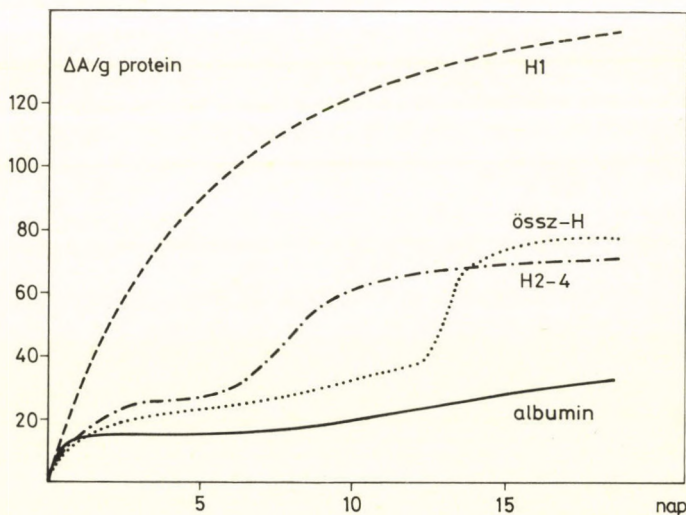
	Hiszton	Glikált hiszton
C	45,13	45,63
H	2,89	4,49
N	14,43	13,05

amid gélben, változik-e a glikált hisztonok mobilitása (7. ábra). Megfigyelésünk szerint a glukózfelvétellel, vagyis a molekula tömegének növelésével a hisztonnak nemcsak mobilitása, de az aminos csoportok Schiff-bázis képződést követő Amadori-átrendeződése révén a savanyú Coomassie blue festékfelvétele is csökken.

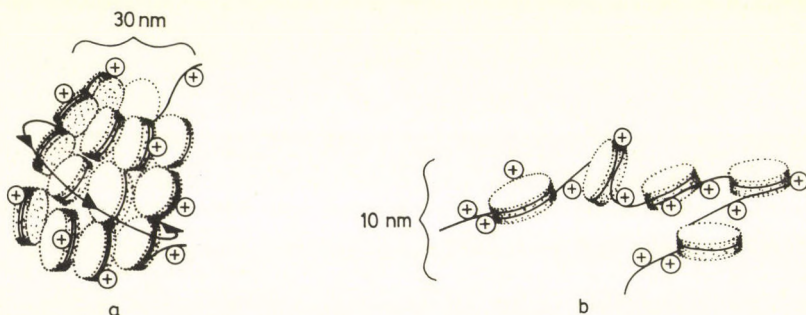


7. ábra. Kontroll *a*), 10 *b*) és 30 *c*) napig glikált összhiszton elektroforetikus képe Coomassie-kék festés után. Az elválasztás 0,15% Triton X100 tartalmú savanyú ureas akrilamid gélben történt

Vizsgáltuk a glikálás kinetikáját is (8. ábra). A H1 hiszton magas glukózfelvétellel exponenciális lefutású telítési kinetikát mutat. Mind az összhiszton, mind az ún. cor-frakció (H2-H4) kinetikája kétlépcsős. A H1 tartalmú összhiszton időben elhúzódó, alig emelkedő stacioner fázis után a 12. nap után vesz csak jelentős mennyiségben glukózt fel, ami a cor-hiszton frakciónál a 7. nap körül már bekövetkezik. Ennek pontos magyarázatát nem tudjuk, de feltételezhető a frakciók interakciója, ami modifikálhatja a glukózfelvételt. E feltevést alátámasztani látszott a következő kísérletünk. A nucleosomában nemcsak DNS-foszfát:hiszton-aminocsoport elektrosztatikus interakcióval lehet számolni, hanem a hiszton (és HMG) fehérjék egymás közti kapcsolatával is. Ilyen konstelláció lehet az izolált sejtmagban. Ha utóbbiból kivonjuk a hisztont, ezek a kötések az elongált, kiterült molekulában felszakadnak, így megemelkedik a molekula bázicitása (9. ábra). A kísérlethez borjú thymus sejtmagokat szukrozében izoláltunk és 8 napig 37 °C-on pH 8,4-es nátrium-



8. ábra. H1-linker, H2-H4 cor- és összhiszton glukózfelvételének időbeni változása



9. ábra. A nukleosoma a) kondenzált és b) kiterített, extendált szerkezete

azid és 300 mmol/l glukóztartalmú 0,15 M-os foszfát pufferben inkubáltuk. Ezt követően az összhisztont kivontuk. Összehasonlításként az izolált sejtmagok másik részéből az összhisztont azonnal kivontuk és ezt a preparátumot inkubáltuk 8 napig az előzőhöz hasonló kísérleti körülmények közt. A hisztionpreparátum glukózfelvétele csaknem kétszerese volt a sejtmag „kondenzált” hisztionénak (5. táblázat), ami megerősítette korábbi feltételezésünket, az intermolekuláris interakciót.

5. táblázat. Egyrészt szukróz-kalcium izolált thymus sejtmagok, másrészt abból kivont összhisztion glukóz felvétele (pH 8,4-es foszfát pufferben oldott 300 mmol glukóz) 37 °C-on 8 napos inkubáció után

	$\Delta E/g$ fehérje
Izolált sejtmag (nukleoprotein)	27
Összhisztion	45

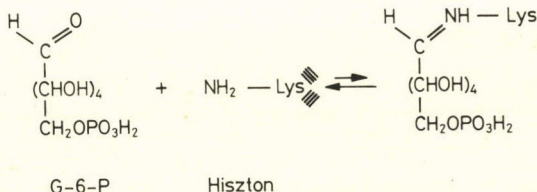
Megvizsgáltuk 5-5 diabeteses és más betegségben elhalt 60 év feletti egyén májából izolált összhisztion glikáltóságát. A cukorbeteg májhisztionja kétségtelenül magasabban glikált (8. táblázat). Ez az érték azonban nem szignifikáns. Ennek oka lehet, a

6. táblázat. Nem diabetesben és diabetesben 60 év felett elhalt egyének máj összhisztionjának glikáltsága az NBT reakcióval mérve, $\Delta A/g$ fehérjében kifejezve

	$\Delta A/g$ fehérje
Normál máj hiszton	1,6—3,1
Cukorbeteg máj hiszton	2,3—4,8

glukóz talán csak részben jut be a sejtmagba, de szerepe lehet e fehérjék rövidebb újrakeletkezési idejének épp úgy [50], mint a DNS—hiszton, hiszton—hiszton szoros asszociációnak is, amire épp előbbi kísérletünkkel mutattunk rá. Ugyanakkor vannak adatok a DNS bázisok glikáltságára is [6]. A glikált DNS gátolhatja a templat funkciót, igazoltan csökkenti a vírus DNS transz-fekciós potenciálját, és a metiláláshoz hasonlóan átrendeződéssel a glikozidos kötést labilizálva a molekula depurinizálódhat, apurinsav keletkezhet. A glikálás így végeredményben az alkiláláshoz hasonlóan a DNS modifikálás révén genetikus konzekvenciákat eredményezhet, de a fokozott tumorgenezisre is hajlamosíthat.

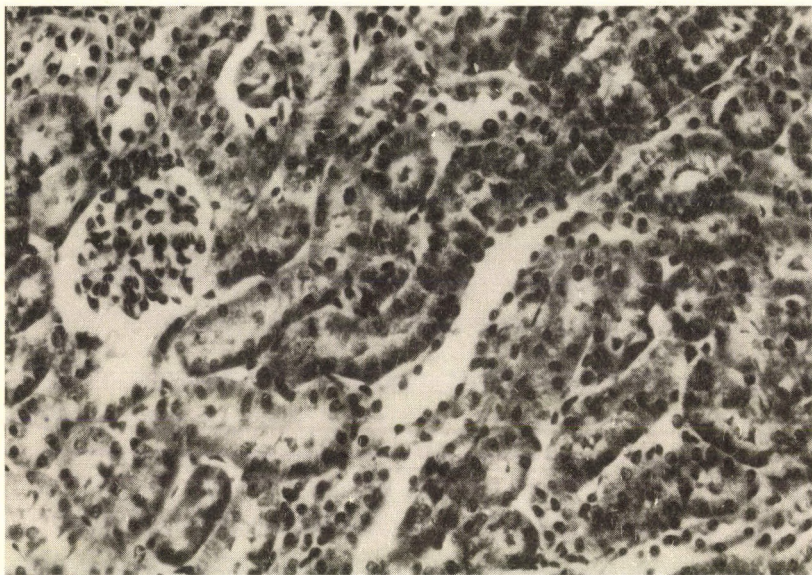
E vizsgálatoknak volt egy konkrét morfológiai eredménye is [23, 24]. Ha a glikálást a sok vonatkozásban kedvezőbb G-6-P-al végeztük, mely 25-ször aktívabb a glukóznál, úgy az aldehid-amin kondenzációval savi gyököket vihetünk a fehérjébe (10. ábra). Szövetmagokból kivontuk a savanyú DNS-t és a visszamaradó bázikus fehérjéket G-6-P-tal inkubáltuk, majd bázikus festékekkel festettünk. Az eredetileg csak savi festékekkel festődő



10. ábra. A hiszton lizin-amino-csoportjának glikálása glukóz-6-foszfáttal

sejtmagok, az abban visszamaradó fehérjék toluidinkékkal vagy haematoxylinnal ragyogóan feltüntethetők (8. kép). Ezzel az eddigi ilyen festési módszerektől eltérően a hisztonokat a bevitt savi gyökön át mutathatjuk ki.

Nem volna teljes áttekintésem, ha nem hívnám fel a figyelmet a hisztonok diagnosztikus jelentőségére is. Alig 10 éve ismerték



8. kép. Triklór-ecetsavval extrahált, DNS negatív patkányvese metszet pH 8,4-es foszfát pufferben glukóz-6-foszfáttal inkubálva, majd pH 4,5-ös toluidinkékkal festve

fel, hogy az autoantitestek nemcsak a DNS-hez, de a hisztonokhoz is kötődnek. Hisztonnal reagáló autoantitest nagy százalékban mutatható ki SLE-ben, gyógyszer indukált lupusban, reumatoid arthritisben, de sok más autoimmun betegségben is [14, 17]. Magunk glikozilált és nem glikált hiszton antisavóval tervezzük diagnosztikus vizsgálatokat. A hisztonok így bevonultak diagnosztikai, immunkémiai fegyvertárunkba, ahol klinikai ké-

miai fruktózamin (= glikált szérumfehérje) meghatározás szisztemás tanulmányozása a glikohiszon vizsgálatainkat indította el.

A metilált, tehát kémiai úton modifikált DNS lehetővé tette a bázikus fehérjék morfológiai feltüntetését. Ugyanakkor a foszfátgyökök és bázisok alkilálása mélyreható biológiai: daganatos, teratogén változást is eredményezett. A glikálás a metiláláshoz viszonyítva kétségkívül enyhébb kémiai beavatkozás. Azonban a glikálással modifikált fehérjestruktúrák eddig feltárt következményei máris elgondolkodtatók, mondhatni aggasztóak, hisz a glukózzal együtt élünk. Támadáspontja ennek is mind a DNS, mind a fehérje, a hiszon, amire néhány adatot mutathattunk be. A folytatást illetően ma különösen aktuális Széchenyi István születése bicentenáriumának előestéjén szavaira emlékezni; ő ugyan a nemességre mint elitre gondolt, én a kutatókra: „Minkünk is mozdulnunk kell, akár akarjuk akár nem, s nehogy hátrafelé nyomattassunk, lépünk inkább előbbre”, ami „csakis szellemi és erkölcsi értékeink kifejlesztésével sikerülhet”. Széchenyi szellemében kell tehát tovább dolgoznunk.

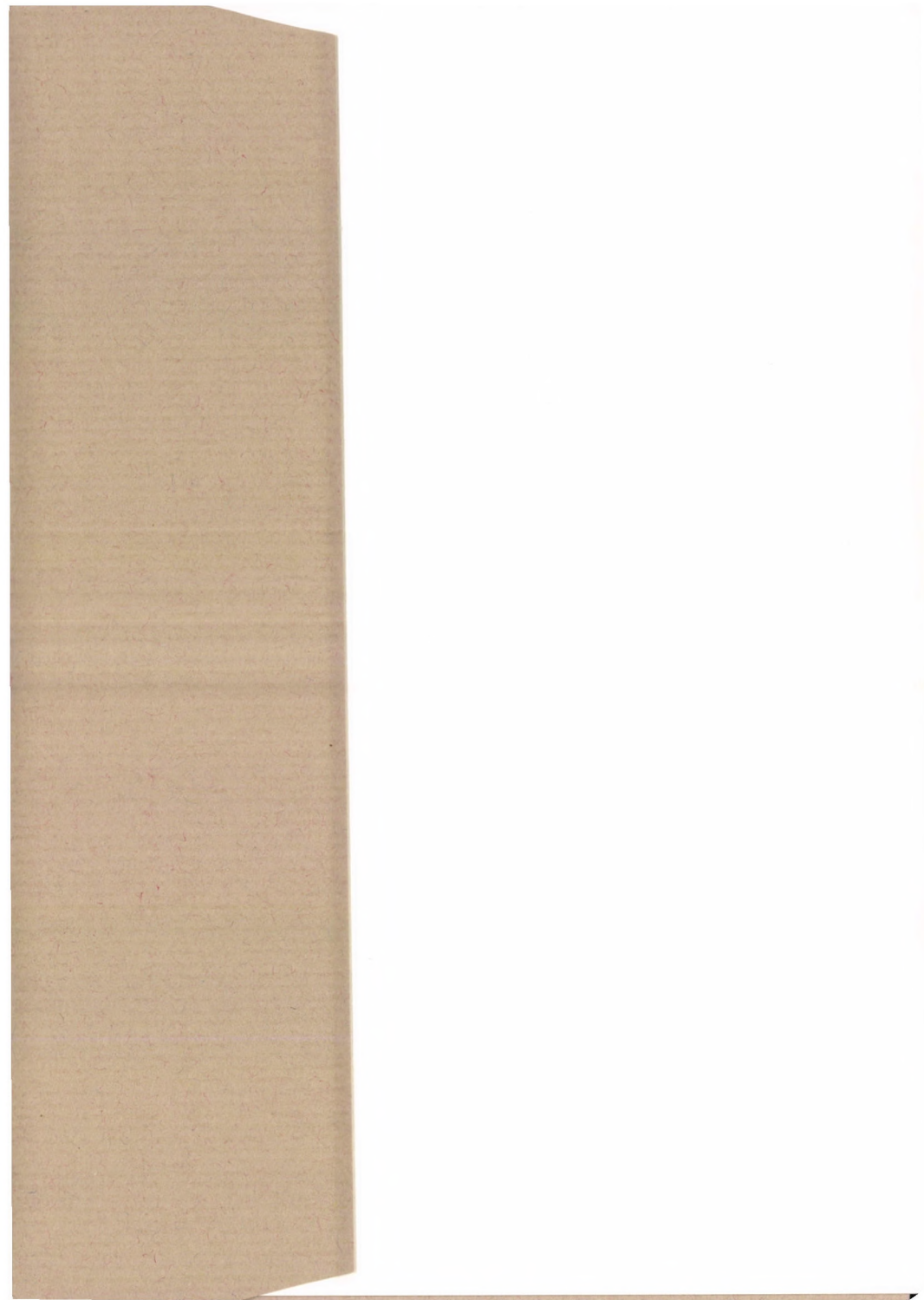
IRODALOM

1. ADAMS, R. L. P. (1990): DNA Methylation. *Biochem. J.* **265**, 309—320.
2. ALLEN, D. W.—SCHROEDER, W. B.—BALOG, J. (1958): Observations on the Chromatographic Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Haemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1628—1634.
3. BERNSTEIN, R. E. (1987): Nonenzymatically Glycosylated Proteins. In *Advance in Clin. Chemistry* **26**, 1—78
4. BIARD—ROCHE, J.—GORKA, C.—LAWRENCE, J. J. (1982): The Structural Role of Histone H1: Properties of Reconstituted Chromatin with Various H1 Subfractions (H1-1, H1-2, and H1). *EMBó J.* **1**, 1487—1492.
5. BRADBURY, E. M.—MACLEAN, N.—MATTHEWS, H. R. (1981): *DNA, Chromatin and Chromosomes*. Balckwell Scientific Publications.
6. BUCALA, R.—MODEL, P.—CERAMI, A. (1984): Modification of DNA by Reducing Sugars: A Possible Mechanism for Nucleic Acid Aging and Age-Related Dysfunction in Gene Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 105—109.
7. CSORDÁS, Á. (1990): On the Biological Role of Histone Acetylation. *Biochem. J.* **256**, 23—38.
8. CURTIS, L. K.—WITZUM, J. L. (1985): Plasma Apolipoprotein AI, AII, B, C1 and E are Glucosylated in Hyperglycemic Diabetic Subjects. *Diabetes* **34**, 452—461.
9. DRUCKREY, H. (1970): Carcinogenic Alkylating Substances, Chemical Constitution and Action. *Angew. Chem.* **9**, 742—753.
10. EINCK, L.—BUSTIN, M. (1985): The Intracellular Distribution and Function of the High Mobility Group Chromosomal Proteins. *Exp. Cell Res.* **156**, 295—310.
11. FELSENFELD, G. (1978): Chromatin. *Nature* **271**, 115—122.
12. FINCH, J. T.—LUTTER, L. C.—RHODES, D.—BROWN, R. S.—RUSHTON, B.—LEVITT, M.—KLUG, A. (1977): Structure of Nucleosome Core Particles of Chromatin. *Nature* **269**, 29—36.
13. FLÜCKINGER, R.—WINTERHALTER, K. H. (1976): In Vitro Synthesis of Hemoglobin A1C. *Febs Lett.* **71**, 356—360.
14. FRITZLER, M. J.—TAN, E. M. (1978): Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* **62**, 560—567.
15. HENDZEL, M. J.—DAVIE, J. R. (1989): Distribution of Methylated Histones and Histone Methyltransferases in Chicken Erythrocyte Chromatin. *J. Biol. Chem.* **264**, 19208—19214.

16. JOBST, K. (1964): Quantitative Cytophotometric Determination of Nuclear Proteins after Alkylation. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.* **13**, 301—309.
17. JOBST, K. (1965): The Effects of Methylation on the Chemical and Submicroscopic Structure of Tissue Nuclei (DNA). *Acta Biol. Hung.* **16**, 113—123.
18. JOBST, K.—SANDRITTER, W. (1965): Cytophotometric Determinations of Basis Protein of Cell Nuclei with Basis Dyes. *Nature* **206**, 204.
19. JOBST, K. (1967): Teratogenous Changes and Tumors in Rats Following Treatment with Methylnitrosourea (NMU). *Neoplasma* **14**, 435—436.
20. JOBST, K.—KELLERMAYER, M. (1967): Submicroscopic Structure and Dry Weight of Isolated Thymus Nuclei Following Trypsin and Salt Treatment. Polarisation Optical, Interference Microscopic and Cytophotometric Studies. *Acta Morph. Acad. Hung.* **15**, 221—244.
21. JOBST, K. (1968): Az alkyláló *N*-nitroso-*N*-methylcarbammiddal (NMC) előidézett kísérletes patkánytumorkok. *Magyar Onkologia* **12**, 32—38.
22. JOBST, K. (1970): Az *N*-nitroso-*N*-methylcarbamid (NMC) hatása az Ehrlich ascites Lettré tumorsejtre. *Magyar Onkologia* **14**, 180—187.
23. JOBST, K.—LAKATOS, A.—HORVATH, A. (1990): Identification of Nucleohistones by Glycosylation and Basic Dyes. *Acta histochem.* **88**, 183—185.
24. JOBST, K.—LAKATOS, A.—HORVATH, A. (1991): The Reaction of Reducing Sugars with Histones. *Biotechn. & Histochem.* **1**, 26—27.
25. JOHNS, E. W. (1971) in: *The Preparation and Characterization of Histone* (PHILIPS, D. M. P. ed.) *Histones and Nucleohistones*, pp. 2—84, Plenum Press, London and New York.
26. JOHNSON, R. N.—METCALF, P. A.—BAKER, J. R. (1982): Fructosamine. A New Approach to the Estimation of Serum Glycoproteins. An Index of Diabetic Control. *Clin. Chim. Acta* **127**, 87—95.
27. KELLERMAYER, M.—JOBST, K.—ANGYAL, T. (1970): Polarization-optical Study of the Ultrastructure of Cell Nuclei in Tissue Culture. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.* **18**, 131—137.
28. KELLERMAYER, M.—LUDANY, A.—JOBST, K.—BUSCH, H. (1977): Effect of Divalent Cations on the Extraction of Nuclear Proteins. *Acta Biochim. Biophys. Hung.* **12**, 353—359.
29. KELLERMAYER, M.—HAZLEWOOD, C. F. (1979): Dynamic Inorganic Ion-Protein Interactions in Structural Organization of DNA of Living Cell Nuclei. *Cancer Biochem. Biophys.* **3**, 181—188.
30. KÉTYI, I.—SZENDREI, L. (1970): Isolation and Selection of Auxotrophic and Fermentative Mutants of *Shigella Flexneri*. *Zbl. Bact. Parasit. Infect. Hyg.* **213**, 515—521.
31. KIM, H. J.—KURUP, I. V. (1982): Nonenzymatic Glycosylation of Human Plasma Low Density Lipoprotein. Evidence for in Vitro and in Vivo Glucosylation. *Metabolism* **31**, 348—353.

32. KRÜGER, F. W.—OSWALD, H.—WALKER, G.—SCHELLEN, E. (1970): Untersuchungen zur Organotropie der Alkylierenden Wirkung von Dimethylnitrosamin (DMNA) und Nitrosomethylharnstoff (NMH) in Vivo. *Z. Krebsforschung* **74**, 434—443.
33. KUHN, R.—WEYGAND, F. (1937): Die Amadori Umlagerung. *Berichte* **70**, 768—772.
34. LAKATOS, A.—JOBST, K. (1989): A *p*-nitro-tetrazoliumkék koncentráció szerepe a fruktozamin standardizálásában. *Lab. Diagn.* **16**, 241—243.
35. LAKATOS, A.—JOBST, K. (1989): Histone Glycosylation. *Acta Biochem. Biophys. Hung.* **24**, 355—359.
36. LAWLEY, P. D.—BROOKES, P. (1963): Further Studies of the Alkylation of Nucleic Acids and their Constituent Nucleotides. *Biochem. J.* **89**, 127—133.
37. LAWLEY, P. D.—THATCHER, C. J. (1970): Methylation of DNA in Cultured Mammalian Cells by MNNG: Influence of Cellular Thiol Concentration of Extent of Methylation and 0-6 of Guanine as a Site of Methylation. *Biochem. J.* **116**, 693—707.
38. LEWIN, B. (1980): Gene Expression 2. Eucaryotic Chromosomes. Organisation of the Genetic Apparatus 283—479. John Wiley & Sons, New York.
39. MCGHEE, J. D.—FELSENFIELD, G. (1980): Nucleosome Structure. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 1115—1156.
40. MONNIER, V. M. (1990): Nonenzymatic Glycosylation, the Maillard Reaction and the Aging Process. *J. Geront.: Biol. Sci.* **45**, B105—11.
41. OLINS, A. L.—OLINS, D. E. (1974): Spheroid Chromatin Units (nu Bodies). *Science* **183**, 330—332.
42. PALOTIE, A. (1990): Monitoring of Myeloid Malignancies by Molecular Biological Tools. *Lab. Diagn.* **17**, 105.
43. PANYIM, S.—CHALKLEAY, R. (1969): A New Histone Found in Mammalian Tissues with Little Cell Division. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 1042—1047.
44. PECHMAN, VON, H. (1885): Ueber Diazomethan. *Chem. Ber.* **28**, 856—871.
45. RICHARDS, B.—PARDON, J.—LILLEY, D.—COTTER, R.—WOOLEY, J. (1977): The Sub-Structure of Nucleosomes. *Cell Biol. Intern. Rep.* **1**, 107—116.
46. ROMHANYI, G. (1967): Submicroscopic Structure of Interphase Nuclei as Revealed by Topo-optical Staining Reactions. *Acta Morph. Acad. Hung.* **15**, 131—143.
47. TUAILLON, N.—MULLER, S.—PASQUALI, J. L.—BORDIGONI, P.—YOUNOU, P.—VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1990): Antibodies from Patients with Rheumatoid Arthritis and Juvenile Chronic Arthritis Analyzed with Core Histone Synthetic Peptides. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **91**, 297—305.
48. UDRANSZKY, L. (1888): Ueber Furfurolreactionen. IV. Ueber den Nachweis von Kohlenhydraten im Menschenharn durch Furfurolbildung. *Zschf. f. Physiol. Chem.* **12**, 377—395.
49. WITZUM, J. L.—MAHONEY, E. M.—BRANKS, M. J.—FISHER, M.—ELAM, R.—STEINBERG, D. (1982): Nonenzymatic Glucosylation of Low-Density Lipoprotein Alters its Biological Activity. *Diabetes* **31**, 283—290.
50. WU, R. S.—PANUSZ, H. T.—HATCH, CH. L.—BONNER, W. M. (1986): Histones and Their Modification. In: *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **20**, 201—263.

A kiadásért felelős
az Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat igazgatója
A nyomdai munkálatokat
az Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat végezte
Felelős vezető: Zöld Ferenc
Budapest, 1993
Nyomdai táskaszám: 21 861
Felelős szerkesztő: Nagy Tibor
Műszaki szerkesztő: Kiss Zsuzsa
Kiadványszám: 146
Megjelent: 1,88 (A/5) ív terjedelemben
HU ISSN 0236-6258



Ára: 123,— Ft 10% áfával